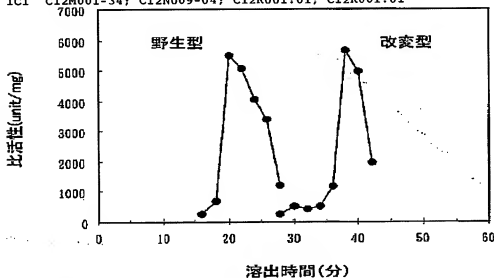


L1 ANSWER 2 OF 3 WPINDEX COPYRIGHT 2004 THOMSON DERWENT on STN
AN 2003-771148 [73] WPINDEX
DNN N2003-617873 DNC C2003-212191
TI Water soluble mutant glucose dehydrogenase useful for assaying glucose in clinical laboratory samples, comprises glutamine, asparagine and threonine substituted by arginine.
DC B04 D16 S03
IN SODE, K
PA (HAYA-I) HAYAIDE K; (SODE-I) SODE K
CYC 101
PI JP 2003093071 A 20030402 (200373)* 10 C12N015-09
WO 2003027294 A1 20030403 (200373) JA C12N015-53 <--
RW: AT BE BG CH CY CZ DE DK EA EE ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU
MC MW MZ NL OA PT SD SE SK SL SZ TR T2 UG ZM ZW
W: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK
DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KP KR KZ
LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO
RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT T2 UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM
ZW
ADT JP 2003093071 A JP 2001-294846 20010926; WO 2003027294 A1 WO 2002-JP9943
20020926
PRAI JP 2001-294846 20010926
IC ICM C12N015-09; C12N015-53
ICS C12M001-34; C12N001-15; C12N001-19; C12N001-21; C12N005-00;
C12N005-10; C12N009-04; C12P021-02; G01N033-48
ICI C12M001-34; C12N009-04; C12R001-01; C12R001-01
7000



AB JP2003093071 A UPAB: 20031112
NOVELTY - Water soluble mutant glucose dehydrogenase which requires pyruroquinolone quinone as a coenzyme, comprises glutamine, asparagine and threonine substituted by arginine.
DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for:
(1) a gene encoding the modified glucose dehydrogenase;
(2) a vector comprising the above gene;
(3) a transformed host cell comprising the above gene;
(4) an organism in which the above gene is integrated into the chromosome;
(5) producing modified glucose dehydrogenase;
(6) a glucose assay kit comprising the modified the glucose dehydrogenase, and
(7) a glucose sensor comprising the modified glucose dehydrogenase.
USE - Used for measuring glucose in clinical laboratory samples by a fixed quantity assay, and in food analysis.
Dwg. 4/6
FS CPI EPI
FA AB; GI; DCN
MC CPI: B04-E02E; B04-E08; B04-F0100E; B04-L0300E; B04-P0100E; B10-A07;

B11-C08E3; B12-K04; D05-C03B; D05-H09; D05-H12B; D05-H12E; D05-H14;
D05-H16; D05-H17B3
EPI: S03-E14H

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年4月3日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/027294 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/53, 9/04, 1/15, 1/19,
1/21, 5/00, C12P 21/02, G01N 33/48

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09943

(22) 国際出願日: 2002年9月26日 (26.09.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-294846 2001年9月26日 (26.09.2001) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 早出 広司 (SODE, Koji) [JP/JP]: 〒152-0013 東京
都目黒区南1-13-16 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 田中 玲子, 外 (TANAKA, Reiko et al.): 〒
100-6036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞
が関ビル36階大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正受
領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: グルコース脱水素酵素

(57) Abstract: A modified water-soluble glucose dehydrogenase which acts with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme and in which one or more amino acid residues present on the surface of the enzyme molecule and present in a region which is thought to have side chains exposed on the molecular surface and not interacting with other residues and is thought to be neither an enzymatically active area nor a substrate-bonding area have been replaced with arginine. The one or more amino acid residues are preferably selected from the group consisting of glutamine, asparagine, and threonine. This modified enzyme can be efficiently recovered after production by recombination.

(57) 要約:

ピロロキリノキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、
酵素分子表面上に存在し、側鎖が分子表面上に露出しており他の残基と大きな相
互作用はしていないと考えられ、酵素活性部位または基質結合部位ではないと考
えられる領域に存在するアミノ酸残基、好ましくは、グルタミン、アスパラギン、
トレオニンからなる群より選択される1またはそれ以上のアミノ酸残基がアルギ
ニンで置換されている改変型グルコース脱水素酵素が開示される。この改変型酵
素は、組換え生産した後、効率的に回収することができる。

WO 03/027294 A1

明細書

グルコース脱水素酵素

技術分野

- 5 本発明はピロロキノリンキノン（PQQ）を補酵素とするグルコース脱水素酵素（GDH）の特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素に関する。本発明の改変型酵素は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

10 背景技術

- 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ（GOD）あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素（G6PDH）を用いる酵素法により定量されていた。最近、新たな酵素としてピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素（PQQGDH）の応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、
- 20 アッセイ分野への応用が期待されている。

PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコンラクトンを生成する反応を触媒する。

- PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、
- 25 種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており（*Biosci. Biotech. Biochem.*（1995），59（8），1548-1555）、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている（*Mol. Gen. Gene*

- t. (1989), 217:430-436)。A. calcoaceticus由来水溶性PQQGDHは、分子量約50 kDaのサブユニット2つからなるホモダイマーを形成する水溶性酵素であり、活性を示すためにPQQとCa²⁺を必要とし、2200U/mg~7400U/mgという高い酵素活性を示す。
- 5 等電点が、PQQと結合していないアポ酵素で約9.2、ホロ酵素で約10.2である塩基性蛋白質であることなどが知られている(K. Matsushita, et al. (1995) Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1548-1555)。また、水溶性PQQGDHのX線構造解析の結果が発表されており(A. Oubrie, et al. (1999) J. Mol. Bio., 289, 319-333およびA. Oubrie, et al. (1999) The EMBO Journal, 18 (19), 5187-5194)、水溶性PQQGDHの立体構造やPQQおよびCa²⁺の推定存在位置などが明らかにされている。
- 10

- 水溶性PQQGDHの精製に関しては、Duineらが、A. calcoaceticusから水溶性PQQGDHを完全精製し、10%の回収率で640U/mgの比活性を得ている(P. Dokter, et al. (1986) Biochem. J., 239, 163-167)。彼らは菌体(A. calcoaceticus)から調製した水溶性画分に対し、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの順で行い、SDS-PAGEで約50 kDaのシングルバンドを確認した。その後の研究で44%の回収率で2214U/mgの比活性を得た(K. Matsushita, et al. 上掲)。さらに、彼らは水溶性PQQGDHの構造遺伝子を大腸菌に組み込んで組み換え生産し、陽イオン交換クロマトグラフィー2回と疎水クロマトグラフィーを行って41%の回収率
- 15
- 20
- 25
- で7400U/mgの比活性を得ている(A. J. J. Olsthoorn, and J. A. Duine (1996) Archives of Biochem. Biophys., 336, 42-48)。

PQQGDHを効率的に生産する方法としては、大腸菌において組み換え生産する方法、および酵母あるいは腸内性細菌群を宿主として組み換え生産する方法

が報告されている。水溶性PQQGDHをこのように組み換え発現させた場合、この酵素は水溶性蛋白質として発現され、その等電点が非常に高く塩基性であるため、精製には主として陽イオン交換クロマトグラフィーが用いられる。しかし陽イオン交換クロマトグラフィーだけで宿主に由来する他の塩基性蛋白質を取り除くことは難しい。

一方、塩基性蛋白質の精製方法としては、陽イオン交換カラムへの親和性を向上させる目的で、アフィニティーテールとしてC末端にアルギンテールを付加する方法が知られている (H. M. Sassenfeld, and S. J. Brewe (1984) *Biotechnology*, 2, 76-81)。この方法を塩基性蛋白質である水溶性PQQGDHに応用すれば、水溶性PQQGDHの表面電荷が増加し、陽イオン交換カラムに対する親和性を向上させることができるかと期待される。しかし、このようなアルギンテールを付加した蛋白質を大腸菌で生産させると、大腸菌の外膜プロテアーゼによりアルギニン残基がC末端側から切断されて、単一の酵素標品を得ることが困難であるという問題点があった。

したがって、本発明は、組み換え生産されたPQQGDHの効率的な回収を可能とする、改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良して、精製が容易にできる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの表面に存在する特定の残基をアルギニンに置換することにより、陽イオン交換クロマトグラフィーにより容易に精製することが可能な変異型酵素を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、酵素分子表面上に存在する、グルタミン、アスパラギン、トレオニンからなる群より選択される1またはそれ以上のアミノ酸残基がアルギニンで置換されている改変型グルコース脱水素酵素を提供する。

好ましくは、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵

素は、*Acinetobacter calcoaceticus*由来の水溶性PQQGDHである。

- 本発明はまた、*Acinetobacter calcoaceticus*由来のピロキノリンキノン補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、
- 5 209番目のグルタミン残基、240番目のアスパラギン残基および389番目のトレオニン残基からなる群より選択される1またはそれ以上のアミノ酸残基がアルギニンで置換されている改変型グルコース脱水素酵素を提供する。より好ましくは、209番目のグルタミン残基、240番目のアスパラギン残基および389番目のトレオニン残基がそれぞれアルギニンで置換されている。
- 10 本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

15 図面の簡単な説明

図1は、本発明の改変型酵素をコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

図2は、本発明において用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

図3は、本発明の改変型酵素のSDS-PAGEを示す写真図面である。

- 20 図4は、本発明の改変型酵素のクロマトグラフィーの各画分についての酵素活性を示す。

図5は、本発明の改変型PQQGDHを用いるグルコースのアッセイを示す。

図6は、本発明の改変型PQQGDHを用いる酵素センサーのキャリブレーションカーブを示す。

25

発明を実施するための最良の形態

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。また、本出願の優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2001-294846号の明細書に記載の内

容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。

改変型PQQGDHの設計

- 本発明の改変型PQQGDHを製造するためには、天然の水溶性PQQGDHの立体構造情報に基づいて、アミノ酸置換により酵素活性および安定性などの諸性質を変えることなく、表面電荷を増加させることができる部位を選択する。選択は、以下の基準にしたがって行う：水溶性PQQGDH蛋白質の表面上に存在すること、中性の残基であること、極性の残基であること、側鎖が分子表面上に露出しており他の残基と大きな相互作用はしていないと考えられること、酵素活性部位または基質結合部位ではないと考えられる領域に存在すること。このようにして選択されたアミノ酸残基を、塩基性残基、特にアルギニン残基に置換することにより、酵素活性に多大な影響を及ぼすことなく、蛋白質の表面電荷を増大することができる。好ましくは、変異すべきアミノ酸残基は、グルタミン、アスパラギンおよびトレオニンからなる群より選択される。

- このようにして得られる本発明の改変型PQQGDHは、増大した表面電荷により陽イオン交換クロマトグラフィーに強固に結合するため、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて宿主由来の他の蛋白質から容易に分離精製することができる。

- また、本発明の改変型グルコース脱水素酵素においては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

- さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、本発明の教示にしたがって分子表面に存在する中性の極性残基を選択し、そのアミノ酸残基をアルギニンに置換することにより、表面電荷が増大したPQQGDHを容易に得ることができる。

改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、置換すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列

を、アルギニンをコードする塩基配列に置換することにより構築することができ
る。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野に
おいて知られており、例えば、Sambrookら、"Molecular C
loning; A Laboratory Manual", 第2版, 19
5 89, Cold Spring Harbor Laboratory Pr
ess, New Yorkに記載されている。

このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミ
ド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白
質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られて
10 おり、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いるこ
とができる。

上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養
し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで
破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に
15 放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることが
できる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQ
GDHを培養液中に分泌させることもできる。

次に、得られた水溶性画分を、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製す
る。精製は、蛋白質のクロマトグラフィー精製についての当該技術分野において
20 一般に知られる教科書の記載にしたがって行うことができる。蛋白質の精製に用
いることができる種々の陽イオン交換クロマトグラフィー用カラムが当該技術分
野において知られており、これらのいずれを用いてもよい。例えば、CM-5 P
W、CM-Toyopearl 650M、SP-5PW（以上、東ソー株式会
社）、S-Sepharose、Mono-S、S-Resource（以上ファルマシ
25 ア社）を用いることができる。カラムを適当なバッファーで平衡化し、試料をカ
ラムに負荷し、未吸着成分を洗い流す。バッファーとしては、例えばリン酸バッ
ファー、MOPSバッファー等を用いることができる。

次に、塩濃度のより高いバッファーを用いて、カラムに吸着された成分を溶出
する。塩濃度は、塩濃度の異なる複数のバッファーを用いて、段階的に、直線勾

配により、またはこれらの組み合わせにより変化させることができる。試料の溶出は吸光度測定などによりモニターし、適当な量ずつ分取する。各画分について酵素活性を測定して、所望の画分を回収することにより、本発明の改変型酵素を精製標品として得ることができる。

- 5 さらに、陽イオンクロマトグラフィーの前または後に、必要に応じて、濾過、透析、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の、蛋白質の精製に関して当該技術分野において知られる他の手法による精製を行ってもよい。

- 10 蛋白質の純度は、SDS-PAGE、HPLC等の、当該技術分野において知られる方法を用いて容易に確認することができる。

酵素活性の測定方法

- 15 本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PM

S（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2，6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

グルコースアッセイキット

- 20 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならび
- 25 に使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アゴ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化することができ、アゴ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドの遊離官能基をブロックする。

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

実施例

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示される *Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、変異の導入を行った。プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、*Acinetob*

acter calcoaceticus 由来 PQQGDH をコードする構造遺伝子を挿入したものである (図 1)。常法に従って部位特異的変異法により、グルタミン 209、アスパラギン 240 およびトレオニン 389 をコードする塩基配列をそれぞれアルギニンをコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異は

5 プラスミド pGB2 を用いて、図 2 に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を以下に示す。

Q209R

5'-gCCAACTCAACgTgAACTgAATg-3' (配列番号 3)

D229R

10 5'-CTTAAATCTTCgTggAAGTATTC-3' (配列番号 4)

N240R

5'-CCAAgTTTTCgCggggTggTTAg-3' (配列番号 5)

ベクタープラスミド pKF18k (宝酒造 (株)) に *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 PQQGDH をコードする遺伝子の一部を含む Kpn I-Hind

15 III 断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50 fmol と宝酒造 (株) 製 Mutan (登録商標) -Express Km キットに付属のセレクトションプライマー 5 pmol、リン酸化したターゲットプライマー 50 pmol を全体 (20 μ l) の 1/10 量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100°C、3 分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1 本鎖にした。セ

20 レクションプライマーは pKF18k のカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを 5 分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに 3 μ l の同キットエクステンションバッファー、1 μ l の T4 DNA リガーゼ、1 μ l の T4 DNA ポリメラーゼおよび 5 μ l の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。

25 これを DNA のミスマッチ修復能欠損株である *E.coli* BMH71-18 mutS に形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

次に、ここから抽出したプラスミドを *E.coli* MV1184 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド p

G B 2 上の野生型 P Q Q G D H をコードする遺伝子の K p n I-H i n d III 断片と入れ替え、Q 2 0 9 R, D 2 2 9 R ならびに N 2 4 0 R の 3 箇所の変異を有する改変型 P Q Q G D H (以下改変型 P Q Q G D H) の遺伝子を構築した。

実施例 2

5 改変型酵素の調製

- 野生型または改変型 P Q Q G D H をコードする遺伝子を、E. coli 用の発現ベクターである p T r c 9 9 A (ファルマシア社) のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。これを 4 5 0 m l の L 培地 (アンピシリン 5 0 μ g / m l 含有) で坂口フラスコを用いて 3 7 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養し、1 m M C a C l₂、5 0 0 μ M P Q Q を含む 7 L の L 培地に植菌した。培養開始後約 3 時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度 0. 3 m M になるように添加し、その後 1. 5 時間培養した。菌体を遠心分離 (5, 0 0 0 \times g, 1 0 m i n, 4 $^{\circ}$ C) で集菌した後、0. 8 5 % N a C l 溶液で 2 回洗浄した。この菌体を 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7. 0) で懸濁し、フレンチ・プレスで破碎 (1 1 0 M P a) した後、遠心分離 (1 5, 0 0 0 \times g, 1 5 m i n, 4 $^{\circ}$ C) を 2 回行い、未破碎菌体を沈殿として除去した。この上清を超遠心分離 (4 0, 0 0 0 r. p. m., 9 0 m i n, 4 $^{\circ}$ C) し、その上清を水溶液画分として得た。これを A バッファー (1 0 m M M O P S - N a O H 緩衝液 (p H 7. 0)) で 4 $^{\circ}$ C にて一晩透析し、粗精製画分を得た。
- ### 20 実施例 3

陽イオンクロマトグラフィーによる精製

- 実施例 2 で調製した粗精製画分は、カラムに吸着させる前に 0. 2 μ m のフィルターでろ過した。カラムは C M - 5 P W (東ソー株式会社) を使用し、A バッファーとして 1 0 m M M O P S - N a O H 緩衝液 (p H 7. 0)、B バッファーとして 0. 8 M N a C l + 1 0 m M M O P S - N a O H 緩衝液 (p H 7. 0) を用いた。

まずカラムを A バッファーで平衡化させ、サンプルを吸着させた後、カラム容量の 5 倍量の A バッファーで洗浄した。その後、B バッファーを用いて 0 M - 0. 6 4 M N a C l (1 2 0 m i n) の直線グラジエントをかけ、目的の酵素を溶

出させた。なお、流速は0.5 ml/minで行い、280 nmの吸光波長で溶出蛋白質を検出した。また、溶出液の分取は2 minずつ行なった。野生型水溶性PQQGDHは陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて約20分、塩濃度80 mM付近に溶出のピークを示し、改変型水溶性PQQGDHは約38分、塩濃度

5 190 mM付近に溶出のピークを示した。

溶出ピークの画分をSDS-PAGEで分析した結果を図3に示す。改変型水溶性PQQGDHについては、目的の大きさである50 kDaのシングルバンドが得られ、この1回のクロマトグラフィーでほぼ完全に精製することができた。これに対し、野生型水溶性PQQGDHでは夾雑物のバンドが見られた。

10 実施例4

酵素活性の測定

酵素活性の測定は10 mM MOPS-NaOH緩衝液(pH 7.0)中においてPMS(フェナジメトサルフェート)-DCIP(2,6-ジクロロフェノールインドフェノール)を用い、DCIPの600 nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1 μmol のDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH 7.0におけるモル吸光係数は1.6 $\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とした。

クロマトグラフィーの各画分についての酵素活性を図4に示す。横軸は溶出時間、縦軸はGDH活性である。

20 実施例5

酵素活性および基質特異性の評価

クロマトグラフィーで得られた活性画分および未吸着画分、粗精製画分を、100倍量の10 mM MOPS-NaOH緩衝液(pH 7.0)で4℃にて一晩透析し、それぞれ1 μM PQQ、1 mM CaCl_2 存在下で1時間以上ホロ化した。これを187 μl ずつ分注し、3 μl の活性試薬(6 mM DCIP 48 μl , 600 mM PMS 8 μl , 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 16 μl)および基質として、20 mMのグルコース、2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-O-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースまたはマルトース溶液10 μl を加え、実施例4に示す方法に

より室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、 K_m および V_{max} を求めた。

グルコースに対する活性は、野生型水溶性PQQGDHが約7100U/mg、改変型水溶性PQQGDHが約7800U/mgであり、ほぼ同じ活性を示した。

- 5 また、グルコース以外の各基質に対する K_m 値と V_{max} 値は、野生型および改変型水溶性PQQGDHのいずれもほぼ同様の値を示し、変異導入による基質特異性の変化は見られなかった。

実施例 6

グルコースのアッセイ

- 10 改変型PQQGDHを用いてグルコースをアッセイした。改変型酵素を、 1μ MPQQ、 1mM CaCl_2 存在下で1時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび 5μ MPQQ、 10mM CaCl_2 存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例4に記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの600nmの吸光度の変化を指標とした。図5に示されるように、改変型PQQGDHを用いて、
- 15 5mM – 50mM の範囲でグルコースの定量を行うことができる。

実施例 7

酵素センサーの作製および評価

- 5 Uの改変型酵素にカーボンペースト20mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む 10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で30分間処理した後、20mMリジンを含む 10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を
- 25 10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。得られたキャリブレーションカーブを図6に示す。すなわち、本発明の改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用いて、 1mM – 12mM の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

産業上の利用性

本発明により、組み換え生産されたPQQGDHの効率的な回収を可能とする、
改変型水溶性PQQGDHが提供される。本発明の改変型酵素は、臨床検査や食

5 品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

請求の範囲

1. ピロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、酵素分子表面上に存在する、グルタミン、アスパラギン、トレオニンからなる群より選択される1またはそれ以上のアミノ酸残基がアルギニンで置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
2. 前記ピロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素が *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHである、請求項1記載の改変型グルコース脱水素酵素。
3. *Acinetobacter calcoaceticus* 由来のピロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、209番目のグルタミン残基、240番目のアスパラギン残基および389番目のトレオニン残基からなる群より選択される1またはそれ以上のアミノ酸残基がアルギニンで置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
4. 209番目のグルタミン残基、240番目のアスパラギン残基および389番目のトレオニン残基がそれぞれアルギニンで置換されている、請求項3記載の改変型グルコース脱水素酵素。
5. 請求項1-4のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。
6. 請求項5に記載の遺伝子を含むベクター。
7. 請求項5に記載の遺伝子を含む形質転換体。
8. 請求項5に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれた生物。
9. 請求項8記載の生物を用いることを特徴とする、請求項1-4のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素の製造方法。
10. 請求項1-4のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。
11. 請求項1-4のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

1/6

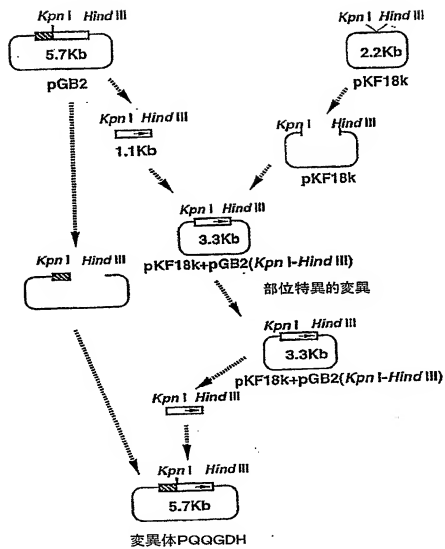


図 1

2/6

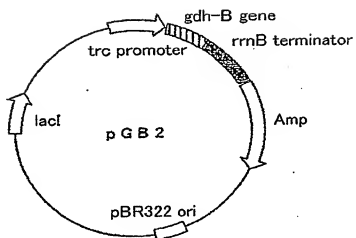


図 2

差替え用紙(規則26)

3/6

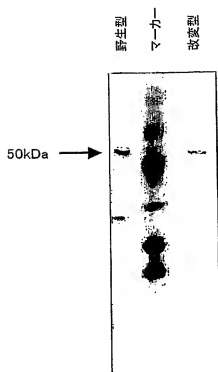


図 3

差 替 え 用 紙 (規則26)

4/6

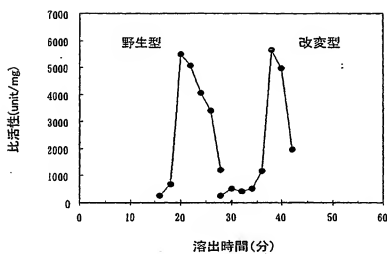


図 4

5/6

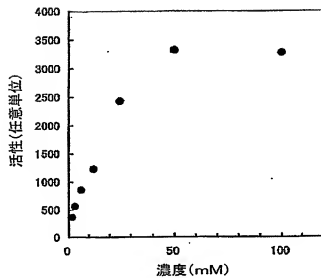


図 5

6/6

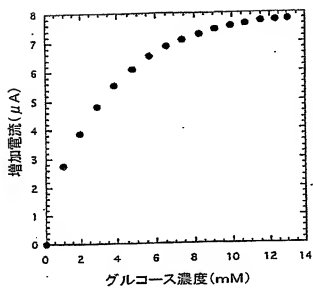


図 6

1/5

Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase

<130> psg900870

5 <150> JP 2001-294846

<151> 2001-09-26

<160> 5

<210> 1

<211> 454

10 <212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn

1 5 10 15

15 Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

20 50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile

85 90 95

25 Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu

115 120 125

Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His

2/5

130 135 140
 Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160
 Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
 5 165 170 175
 Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
 180 185 190
 His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
 195 200 205
 10 Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
 210 215 220
 Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
 15 245 250 255
 Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
 260 265 270
 Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys
 275 280 285
 20 Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
 290 295 300
 Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
 25 325 330 335
 Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser
 340 345 350
 Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu
 355 360 365

3/5

Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
 370 375 380
 Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
 385 390 395 400
 5 Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415
 Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430
 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 10 435 440 445
 Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450
 <210> 2
 <211> 1612
 15 <212> DNA
 <213> *Acinetobacter calcoaceticus*
 <400> 2
 agctaatttt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60
 cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaacocctta ttagaggttt aaaaattoto 120
 20 ggaaattttt gacaatttat aaggtggaca catgaataaa catttatgg ctataattgc 180
 ttatttaago gctgttcago tagttacact ctacgcattt gctgatgtto ctctaatcc 240
 atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagtatttc tatctaatct 300
 aaataagcog catgcottgt tatggggacc agataatcaa atttggttaa ctgagcgagc 360
 aacaggtaag attctaaag ttaatcaga gtoggtagt gtaaaaacag tttttcaggt 420
 25 accagagatt gtcaatgatg ctgatgggca gaatggttta ttaggttttg ccttcacatc 480
 tgatttttaa aataatcctt atatctatat ttcaggtaca tttaaaaa ogaatctac 540
 agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat togtogttat acctataata aatcaacaga 600
 taogctcag aagcagctcg atttattago aggattacot toatcaaaag accatcagtc 660
 aggtctgott gtcatgggco cagatcaaaa gattttattat acgattggcg accaaggcgc 720

- taaccagott gottatttgt tottgccaaa tcaagcacia catacgccaa ctcaacaaga 780
 actgaatggt aagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgottaa atottgatgg 840
 aagtattoca aaggataatc caagttttaa cggggtagtt agccatattt atacacttgg 900
 acatcgtaat cgcagggt tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960
 5 aggcocaaac totgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020
 gaatgtagca gttataaag atgatatgg ctatgcttat gcaattattt cagcagcago 1080
 caataagta attaaggatt tagotcaaaa tggagtaaaa gtacgcgcag gggtoctgt 1140
 gacgaagaa totgaatgga ctggtaaaaa cttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200
 cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttggga gagatgaact acatttgotg 1260
 10 gccaacagtt gcacgtcat ctgcctatgt ctataagggo ggtaaaaaag caattactgt 1320
 ttgggaaat acattattgg ttccatcttt aaaaactggt gtcattttcc gtattaaagt 1380
 agatccaact tatagcaata cttatgatga cgtgtacog atgtttaaga gcaacaaccg 1440
 ttatcgtgt gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtotta tatgtattaa ctgatactgc 1500
 cggaaatgc caaaaagatg atggotcagt acaaatata ttagaaaaoc caggatctct 1560
 15 cattaagttc acotataagg ctaagtaata cagtgcatt aaaaaccoga tc 1612
- <210> 3
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
- 20 <220>
 <223> primer for point mutation
- <400> 3
 gccaaactcaa cgtgaactga atg
 <210> 4
- 25 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer for point mutation

5/5

<400> 4

cttaaatctt cgtggaagta ttc

<210> 5

<211> 13

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 5

10 ccaagttttc ggggggtggt tag

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl¹ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00,
C12P21/02, G01N33/48//C12Q1/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl¹ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00,
C12P21/02, G01N33/48//C12Q1/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 00/61730 A1 (Koji SODE), 19 October, 2000 (19.10.00), Full text & JP 2000-350588 A & EP 1167519 A1	<u>1-3, 5-11</u> 4
X A	WO 00/66744 A1 (Koji SODE), 09 November, 2000 (09.11.00), Full text & JP 2000-312588 A & EP 1176202 A1	<u>1-3, 5-11</u> 4
A	CLETON-JANSEN, A. M. et al., Cloning characteriza- -tion and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50,000 quinoprotein glucose dehydrogenase from Acinetobacter calcoaceticus., Mol. Gen. Genet., 1989, Vol.217, No.2/3, p.30-6	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 25 November, 2002 (25.11.02)

Date of mailing of the international search report
 10 December, 2002 (10.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P21/02, G01N33/48
//C12Q1/32

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P21/02, G01N33/48
//C12Q1/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
SwissProt/PIR/GeneSeq
WP1 (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 00/61730 A1 (早出 広司) 2000.10.19, 全文 & JP 2000-350588 A & EP 1167519 A1	1-3, 5-11/4
X/A	WO 00/66744 A1 (早出 広司) 2000.11.09, 全文 & JP 2000-312588 A & EP 1176202 A1	1-3, 5-11/4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.11.02

国際調査報告の発送日

10.12.02

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
新見 浩一

4B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3447

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	CLETON-JANSEN, A.M. et al., Cloning, characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50,000 quinoprotein glucose dehydrogenase from <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> . Mol. Gen. Genet., 1989, Vol. 217, No. 2/3, p. 30-6.	1-11